
This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

2

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 39/00, 9/08, 9/107, 39/39</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/38528 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. August 1999 (05.08.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00524 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Januar 1999 (27.01.99) (30) Prioritätsdaten: 198 03 453.9 30. Januar 1998 (30.01.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-55216 Ingelheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BUSCHLE, Michael [DE/AT]; Hyrtlstrasse 35/1/1, A-2345 Brunn/Gebirge (AT). BIRNSTIEL, Max [CH/AT]; Skodagasse 14-16, A-1080 Wien (AT). SCHMIDT, Walter [DE/AT]; Steingasse 2a/16, A-1030 Wien (AT). (74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER INGELHEIM GMBH; Laudien, Dieter, Postfach 200, D-55216 Ingelheim (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>	
<p>(54) Title: VACCINE FORMULATIONS (54) Bezeichnung: VAKZINEFORMULIERUNGEN (57) Abstract The invention relates to a vaccine containing one or more synthetic or highly purified natural peptides or proteins as antigen(s) as well as one or more adjuvants. The vaccine is presented as a solution or emulsion which is free from inorganic salt ions or has a low concentration of salt ions. Said vaccine preferably contains substances able to make it isotonic, especially sorbitol. (57) Zusammenfassung Eine Vakzine, enthaltend ein oder mehrere synthetische oder hochgereinigte natürliche Peptide oder Proteine als Antigen(e) sowie ein oder mehrere Adjuvantien liegt als Lösung bzw. Emulsion vor, die frei ist von anorganischen Salzionen bzw. eine niedrige Salzionenkonzentration aufweist. Bevorzugt enthält sie Substanzen mit der Fähigkeit, die Vakzine isotonisch zu machen, insbesondere Sorbit.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

VAKZINEFORMULIERUNGEN

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf das Gebiet
5 der Vakzinen.

Die immunogene Wirkung von traditionellen Vakzinen
beruht zumeist auf abgetöteten oder abgeschwächten
Krankheitserregern. In den traditionellen Vakzinen
wirken die Verunreinigungen der Vakzine selbst oder
10 andere Komponenten von Organismen als Adjuvantien, die
die immunogene Wirkung des eigentlichen Antigens
verstärken und/oder verlängern. Z.B. enthält der
Diphtherie-Tetanus-Keuchhusten-Impfstoff zwei potente,
von der Ganzzell-Keuchhusten-Vakzine stammende
15 Adjuvantien (LPS = Lipopolysaccharid sowie PT =
Pertussistoxin); ebenso haben die Ganzzell-Typhus- und
Choleraimpfstoffe potente Adjuvantien (LPS sowie
Choleratoxin); die BCG-Vakzine (Bacillus Calmette
Guerin) hat starke nicht-spezifische
20 immunstimulatorische Wirkungen.

Im Gegensatz zu den komplexen traditionellen
Impfstoffen enthalten die modernen Vakzinen
synthetische, rekombinante oder hochgereinigte Antigene
in Form von Proteinen oder Peptiden. Diese Vakzinen
25 gelten als sicherer, weisen jedoch im allgemeinen den
Nachteil geringerer Immunogenität auf. Um diesen
Nachteil zu kompensieren, werden den Vakzinen
Adjuvantien beigegeben, um die spezifische Immunantwort
auf Antigene zu verstärken und verlängern. Einige

Adjuvantien haben die Eigenschaft, die T-Zellproliferation und die zelluläre Immunantwort zu verstärken.

Die meisten der bisher verwendeten Adjuvantien weisen jedoch Nebeneffekte auf, auch erfüllen diese Adjuvantien nicht die Anforderungen, die an die Sicherheit von Adjuvantien gestellt werden, wie Stabilität im Hinblick auf Adjuvanswirkung, minimale Toxizität ohne Wechselwirkung mit dem Antigen, ferner Abbaufähigkeit im Organismus sowie Fehlen einer eigenen immunogen Wirkung.

Eine Übersicht von gängigen Adjuvantien, die bisher für Vakzinen in Betracht gezogen wurden, wird von Vogel, 1995, und von Gupta und Siber, 1995, gegeben. Dazu zählen: anorganische Adjuvantien in Gelform (Aluminiumhydroxid/Aluminiumphosphat, Calciumphosphat); bakterielle Adjuvantien, wie Monophosphoryllipid A und Muramylpeptide, teilchenförmige Adjuvantien, wie die sog. ISCOMS („immunostimulatory complexes“), Liposomen und bioabbaubare Mikrosphären, Adjuvantien auf der Grundlage von Ölemulsionen und Emulgatoren, wie Freund's Adjuvans oder IFA („Incomplete Freund's Adjuvans“), Saponine (wie QS-21), Squalen; synthetische Adjuvantien, wie nicht-ionische Block-Copolymere, Muramylpeptidanalogue, synthetisches Lipid A, synthetische Polynukleotide und polykationische Adjuvantien, wie Polyarginin oder Polylysin (WO 97/30721).

Die Wahl eines Adjuvans stellt in der Regel einen Kompromiß dar, der das Ergebnis einer Abwägung zwischen

Toxizität und Adjuvanswirkung der jeweiligen Substanz ist.

Bei Vakzineformulierungen wurde bisher im allgemeinen Bedacht auf Isotonizität genommen, die gängigen
5 Vakzinformulierungen liegen üblicherweise in einer Salzkonzentration vor, die etwa 150 mM NaCl (ca. 300 mosmol/l) entspricht. Gängige Pufferformulierungen sind PBS und HBS (Phosphat-gepufferte bzw. HEPES-gepufferte Salzlösung); z.B. wurde für eine ISCOM-
10 Vakzine PBS pH 7.4 vorgeschlagen (Barr und Mitchell, 1996).

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, eine Vakzineformulierung bereitzustellen, die die Wirkung von Vakzinen auf der Grundlage von Antigenen in
15 Form von Peptiden oder Proteinen verstärkt.

Es wurde überraschend festgestellt, daß die immunogene Wirkung einer adjuvanshaltigen Vakzine auf Peptidbasis gesteigert wird, wenn die Vakzineformulierung eine niedrige Salzionenkonzentration aufweist bzw. frei von
20 Salzen ist.

Die Erfindung betrifft somit eine Vakzine, enthaltend ein oder mehrere synthetische oder hochgereinigte natürliche Peptide oder Proteine als Antigen(e) sowie ein oder mehrere Adjuvantien. Die Vakzine ist dadurch
25 gekennzeichnet, daß sie als Lösung oder Emulsion vorliegt, die frei von anorganischen Salzionen ist bzw. eine niedrige Salzionenkonzentration aufweist.

Im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Vakzine wird unter „niedrige Salzionenkonzentration“ eine

Konzentration verstanden, die gleich oder niedriger ist als ca. 50% der Salzkonzentration einer isotonischen Lösung, was etwa ca. 75 mM Kochsalzlösung entspricht.

Bei der Berechnung der Ionenkonzentration ist zu
5 berücksichtigen, daß im Fall der Verwendung von Peptid- bzw. Proteinantigenen, die als solche eine Ladung aufweisen, diese Ladung nicht in Rechnung gestellt wird.

Bevorzugt ist die Vakzine im wesentlichen frei von
10 Natrium-, Chlorid- und Phosphationen, besonders bevorzugt ist sie im wesentlichen frei von sämtlichen anorganischen Salzionen („im wesentlichen frei“ bedeutet, daß der Vakzine keine Salze zugesetzt wurden, daß jedoch gegebenenfalls von Reagentien stammende
15 Verunreinigungen oder Spuren von Ionen enthalten sein können; ebenfalls nicht eingerechnet werden von Adjuvantien stammende Ionen, z.B. bei Verwendung anorganischer Adjuvantien).

Für den Fall, daß die Vakzine, z.B. von Pufferlösung
20 stammende, Phosphationen enthält, ist sie bevorzugt frei von Natrium- und Chloridionen. Für den Fall, daß sie Natrium- und/oder Chloridionen enthält, ist sie bevorzugt frei von Phosphationen.

In einer Ausführungsform der Erfindung enthält die
25 Vakzine Antigen und Adjuvans in salzfreiem Medium, z.B. in destilliertem Wasser.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Vakzine eine oder mehrere wasserlösliche bzw. wasseremulgierbare Substanzen, die

die Fähigkeit haben, die Vakzine isotonisch zu machen und deren immunogene Wirkung zu verstärken.

Diese Substanzen werden im folgenden als "isotonisch machende Substanzen" bezeichnet. Isotonisch machende Substanzen haben aufgrund ihrer Molekülgröße und molekularen Struktur die Eigenschaft, den physiologischen osmotischen Druck erzeugen zu können.

Bevorzugt sind die isotonisch machenden Substanzen ausgewählt aus der Gruppe der Kohlenhydrate (Zucker, Zuckeralkohole, Oligosaccharide, Polysaccharide), mehrwertige Alkohole, Aminosäuren oder Lipide.

Bevorzugt ist die isotonisch machende Substanz ein Zucker, insbesondere ein Mono- oder Disaccharid wie Maltose, Fruktose, Galaktose oder Saccharose, oder ein Zuckeralkohol, wie Sorbit oder Mannit.

Als Aminosäuren kommen können isotonische, salzfreie Aminosäurelösungen, wie sie z.B. in der parenteralen Ernährung verwendet werden, in Betracht. Derartige Lösungen sind kommerziell erhältlich (z.B. von Leopold, Graz, Österreich); erforderlichenfalls können diese, falls sie Salzionen enthalten, entsalzt werden. Alternativ kommen auch isotonische, salzfreie Lösungen, die einzelne, bevorzugt wasserlösliche, Aminosäuren enthalten, in Frage.

Als Lipide kommen insbesondere isotonische, salzfreie Fettemulsionen in Betracht, wie sie z.B. in der parenteralen Ernährung verwendet werden. Derartige Emulsion sind kommerziell erhältlich (z.B. von Leopold, Graz, Österreich); erforderlichenfalls können diese,

- falls sie Salzionen enthalten, entsalzt werden. Es kommen auch langkettige Kohlenwasserstoffe in Frage (z.B. Paraffinöle), ferner höhere Fettsäuren wie Linolsäure, Linolensäure oder Palmitinsäure,
- 5 Fettsäureester wie Triglyzeride.

Die isotonisch machende Substanz liegt, je noch Molekulargewicht, bevorzugt in einer Konzentration vor, so daß die resultierende Lösung isotonisch oder leicht hypotonisch ist.

- 10 Bevorzugte Zucker- bzw. Zuckeralkoholkonzentrationen liegen im Bereich von ca. 200 - 400 mM, insbesondere im Bereich von 250 - 300 mM. Die Osmolarität der Lösung beträgt zweckmäßig zwischen 200 - 400 mosmol/l, die Lösung kann aber auch stark hypotonisch sein.
- 15 Aminosäurelösungen sollten bevorzugt eine Osmolarität zwischen 200 - 400 mosmol/l aufweisen, können aber auch stark hypotonisch sein.

- Lipidemulsionen weisen ebenfalls bevorzugt eine Osmolarität zwischen 200 - 400 mosmol/l auf, koennen
- 20 aber auch stark hypotonisch sein.

- Zusätzlich zur isotonisch machenden Substanz enthält die Lösung, in der die erfindungsgemäße Vakzine vorliegt, gegebenenfalls eine Puffersubstanz. Dafür kommen in erster Linie HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]
- 25 piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]), oder TRIS (Tris[hydroxymethyl]aminomethane) in Betracht. Eine Puffersubstanz kann erforderlich sein, um die Vakzine auf einen physiologischen pH-Wert einzustellen, wenn die primäre Lösung vom physiologischen Wert abweicht.

Bezüglich der Peptid- bzw. Proteinantigene unterliegt die erfindungsgemäße Vakzine keinerlei Beschränkungen. Bei den Antigenen kann es sich um natürlich vorkommende immunogene Proteine, z.B. von viralen oder bakteriellen Erregern stammende Proteine bzw. deren Fragmente oder zelluläre Abbauprodukte in Form von Peptiden handeln; oder um Tumorantigene bzw. Fragmente davon. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Antigen ein Tumorantigen bzw. ein davon abgeleitetes natürliches oder synthetisches Peptid, in diesem Fall liegt die Vakzine als Tumorkvakzine vor.

Die Menge an wirksamem Antigen in der erfindungsgemäßen Vakzine kann über einen breiten Bereich variieren. Die Menge an Peptid hängt u.a. von der Verabreichungsart und der jeweiligen Formulierung ab. Die zu verabreichende Menge an Peptid kann ca. 0.1 µg bis ca. 10000 µg pro Vakzinierungsdosis betragen, im allgemeinen 1.0 µg bis ca. 1000 µg, insbesondere ca. 10 µg bis ca. 500 µg.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Adjuvans eine Substanz, wie sie in der WO 97/30721, auf deren Offenbarung hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird, als Zusatz für Protein- bzw. Peptidvakzine vorgeschlagen wurde, bevorzugt ein Polykation, wie Polyarginin oder Polylysin, das gegebenenfalls modifiziert ist, z.B. mit einem Zuckerrest.

Als Adjuvans kommen ferner grundsätzlich sämtliche der oben genannten, für Vakzinen auf Peptid- oder Proteinbasis bekannte Adjuvantien in Betracht. Z.B.

- anorganische Adjuvantien in Gelform
(Aluminiumhydroxid/Aluminiumphosphat, Warren et al., 1986; Calciumphosphat, Relyvelt, 1986); bakterielle Adjuvantien wie Monophosphoryllipid A (Ribi, 1984;
- 5 Baker et al., 1988) und Muramylpeptide (Ellouz et al., 1974; Allison und Byars, 1991; Waters et al., 1986); teilchenförmige Adjuvantien, wie die sog. ISCOMS („immunostimulatory complexes“, Mowat und Donachie, 1991; Takahashi et al., 1990; Thapar et al., 1991),
- 10 Liposomen (Mbawuike et al. 1990; Abraham, 1992; Phillips and Emili, 1992; Gregoriadis, 1990) und bioabbaubare Mikrosphären (Marx et al., 1993); Adjuvantien auf der Grundlage von Ölemulsionen und Emulgatoren, wie Freund's Adjuvans oder IFA
- 15 („Incomplete Freund's Adjuvans“ (Stuart-Harris, 1969; Warren et al., 1986), SAF (Allison and Byars, 1991), Saponine (wie QS-21; Newman et al., 1992), Squalen/Squalan (Allison and Byars, 1991); synthetische Adjuvantien, wie nicht-ionische Block-Copolymere
- 20 (Hunter et al., 1991), Muramylpeptidanalogue (Azuma, 1992), synthetisches Lipid A (Warren et al., 1986; Azuma, 1992), synthetische Polynukleotide (Harrington et al., 1978) und polykationische Adjuvantien (WO 97/30721).
- 25 Dem Fachmann kann anhand der oben genannten Fachliteratur geeignete Antigen/Adjuvantienformulierungen definieren und, davon ausgehend, eine isotonische machende Substanz ermitteln, die geeignet ist, die Wirksamkeit der
- 30 Formulierung zu steigern bzw., bei gleicher Wirksamkeit, eine Verringerung des Adjuvansanteils in

der Formulierung zu senken, was bei Adjuvantien mit Nebeneffekten einen entscheidenden Vorteil bietet.

- Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde überraschend festgestellt, daß eine salzfreie, mit Sorbit isotonisch
- 5 gemachte Tumorstoffimpfung, enthaltend ein MHC-bindendes, von einem Tumorstoffantigen abgeleitetes Peptid sowie Polyarginin als Adjuvans, gegenüber einer hinsichtlich Peptid/Adjuvans identischen, herkömmlich formulierten, d.h. eine isotonische Salzkonzentration enthaltenden
- 10 Tumorstoffimpfung eine stärkere Antitumorstoffaktivität aufweist. Es wurde festgestellt, daß die Peptide zusammen mit dem Adjuvans in Sorbitlösung besser löslich sind als in herkömmlichem PBS Puffer. Ohne auf die Theorie festgelegt sein zu wollen, dürfte die verbesserte
- 15 Wirkung der Stoffimpfung, neben der verbesserten Löslichkeit, darauf zurückzuführen sein, daß die Interaktion zwischen Peptid und Adjuvans erleichtert und damit die Wirkung des Adjuvans verstärkt wird. Gegebenfalls ist die verbesserte Wirkung der Stoffimpfung
- 20 außerdem auf eine Co-Adjuvans-Wirkung der isotonisch machenden Substanz, z.B. Sorbit, zurückzuführen, d. h. diese Substanz (Sorbit) hat als solche eine gewisse Adjuvanswirkung, die die Wirkung des primären Adjuvans verstärkt.
- 25 Um eine Stoffimpfung optimal zu formulieren, wird zweckmäßig wie folgt vorgegangen: ausgehend von einem definierten Antigen, das die gewünschte Immunantwort hervorrufen soll, wird in einem ersten Schritt ein auf das Antigen abgestimmtes Adjuvans ermittelt, wie in der
- 30 Fachliteratur, insbesondere in der WO 97/30721, beschrieben. In einem nächsten Schritt wird die Stoffimpfung

dahingehend optimiert, daß der Antigen/Adjuvansmischung bei ansonsten identischer Zusammensetzung unterschiedliche isotonisch machende Substanzen im Sinne der Definition der vorliegenden Erfindungen, bevorzugt Zucker und/oder Zuckeralkohole, in isotonischer bzw. leicht hypotonischer Konzentration zugesetzt werden und die Lösung auf einen physiologischen pH-Wert im Bereich von pH 4.0 bis 10.0, insbesondere 7.4, gebracht wird. Dann wird in einem ersten Schritt, wie im Beispiel der vorliegenden Anmeldung beschrieben, festgestellt, welche Substanzen, bzw. in welcher Konzentration, die Löslichkeit der Antigen/Adjuvanszusammensetzung gegenüber einer herkömmlichen, salzgepufferten Lösung verbessern. Die Verbesserung der Löslichkeitseigenschaften durch einen Substanz-Kandidaten ist ein erster Hinweis darauf, daß diese Substanz eine Steigerung der immunogenen Wirkung der Vakzine hervorzurufen imstande ist.

Da eine der möglichen Voraussetzungen für eine Steigerung der zellulären Immunantwort eine erhöhte Bindung des Antigens an APCs (Antigen präsentierende Zellen) ist, kann in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob die Substanz eine solche Steigerung hervorruft. Dazu kann analog vorgegangen werden wie bei der Definition des Adjuvans, z. B. indem APCs mit fluoreszenzmarkiertem Peptid bzw. Protein, Adjuvans und isotonisch machende Substanz inkubiert werden. Eine durch die Substanz bewirkte erhöhte Aufnahme bzw. Bindung des Peptids an APCs kann durch Vergleich mit Zellen, die mit Peptid und Adjuvans allein bzw mit einer Peptid/Adjuvanszusammensetzung, die in

herkömmlicher Salzpufferlösung vorliegt, versetzt wurden, mittels Durchflußzytometrie bestimmt werden.

In einem zweiten Schritt können die Substanz-Kandidaten *in vitro* daraufhin untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß ihre Gegenwart die Präsentation eines Peptids auf APCs zu steigern vermag, wobei nach den in der WO 97/30721 für die Testung von Peptiden beschriebenen Methoden die MHC-Konzentration auf den Zellen gemessen werden kann.

10 Eine weitere Möglichkeit zur Testung der Effizienz einer Formulierung ist die Verwendung eines *in vitro* Modellsystems. Hierbei werden APCs zusammen mit Adjuvans, Peptid und Kandidatensubstanz inkubiert und die relative Aktivierung eines T-Zellklons, der das verwendete Peptid spezifisch erkennt, gemessen (Coligan
15 et al., 1991; Lopez et al., 1993)

Die Effizienz der Formulierung kann gegebenenfalls auch über die zelluläre Immunantwort durch den Nachweis einer "delayed-type hypersensitivity" (DTH)-Reaktion in
20 immunisierten Tieren gezeigt werden.

Letztlich wird die immunmodulatorische Wirkung der Formulierung im Tierversuch gemessen. Im Falle einer Tumorstoffe, wie im vorliegenden Beispiel, können u.a. etablierte Tumormodelle, bei denen von Immunzellen
25 erkannte Peptidsequenzen bekannt sind, eingesetzt werden. Die Vakzine, enthaltend bei konstanter Peptid/Adjuvans-Zusammensetzung unterschiedliche Puffersubstanzen, wird den Versuchstieren appliziert. Der Schutz vor Tumorstoffe ist ein Maß für die
30 Wirksamkeit einer Tumorstoffe.

Beispiel

Die Versuche wurden durchgeführt, wie in der WO 97/30721 beschrieben.

- a) DBA/2 Mäuse wurden mit einem Gemisch aus 100 µg MHC Klasse I bindendem Peptid SYFPETHI (Bezeichnung "P815 JAK1") und 75 µg Polyarginin (Polymerisationsgrad 70, SIGMA Chemicals, St. Louis MO) pro Tier dreimal in je einwöchigem Abstand geimpft. Die Peptid/Adjuvantslösung wurde in Sorbitlösung (270 mM Sorbit, 5 mM HEPES) oder phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, GIBCO BRL) verabreicht. Kontrollmäuse erhielten entweder 100 µg Peptid/Tier ohne Adjuvants in Sorbitpuffer oder wurden nicht vakzinieren. Eine Woche nach der letzten Vakzinierung wurden 10^4 viable Tumorzellen injiziert und Tumorstadium wöchentlich festgehalten.

Das Ergebnis der Versuche ist in Fig. 1 dargestellt. Die Abbildung zeigt den Vergleich der Effizienz der P815 JAK1-Vakzine in Sorbitlösung gegen eine Vakzine in gepufferter, isotonischer Salzlösung im Tiermodell. Es zeigte sich, daß Tiere, die die Vakzine in Sorbitlösung erhielten, besser geschützt sind als Mäuse, die mit Peptid/polyArginin in PBS geimpft wurden.

- b) Für die Löslichkeitsversuche wurden Gemische aus fluoreszenzmarkiertem Peptid LFEAIEGFI oder GYKDGNEYI hergestellt: 100 µg fluoreszenzmarkiertes Peptid wurde mit 75 µg Polyarginin (Arg; Polymerisationsgrad 70, SIGMA Chemicals, St. Louis MO) entweder in Sorbitlösung oder HEPES-gepufferter Kochsalzlösung (HBS: 20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl) versetzt. Nach drei Stunden wurde

die Menge an gelöster Fluoreszenz durch Bestimmung der Extinktion bei 490 nM gemessen. Als Testprotein wurde das Green Fluorescent Protein verwendet.

Fig. 2 und Fig. 3 zeigen den Vergleich der Löslichkeit
5 der Komplexe nach Mischung in gepufferter Salzlösung
oder Sorbitlösung. Die beiden fluoreszenzmarkierten
Peptide (Fig. 2A und Fig. 2B) und das Green Fluorescent
Protein (GFP; ca. 30 Kd; Fig. 3) wurden in diesen
Versuch einbezogen. Durch Anmischung der Vakzine in
10 Sorbitlösung ergab sich eine deutlich verbesserte
Löslichkeit und Recovery (erhöhte Fluoreszenz) sowohl
mit den beiden getesteten Peptiden als auch mit GFP.

Literatur

- Abraham, E., 1992, Vaccine 10, 461-468
- 5 Allison, A.C., und Byars, N.E., 1991, Mol Immunol 28,
279-284
- Azuma, I., 1992, Vaccine 10, 1000-1004
- Baker, P.J., et al., 1988, Infect Immun 56, 3064-3066
- Coligan, J.E. et al., 1991, Current Protocols in
10 Immunology, Wiley, New York
- Ellouz, F., et al., 1974, Biochem Biophys Res Commun
59, 1317-1325
- Gupta, R.K. und Siber G.R., 1995, Vaccine 13, 1263-1276
- Gregoriadis, G., 1990, Immunol Today 11, 89-97
- 15 Harrington, D.G., et al., 1978, Infect Immun 24,
160-166
- Hunter, R., et al., 1991, Vaccine 9, 250-255
- Lopez, J.A., et al., 1993, Eur. J. Immunol. 23, 217-223
- Marx, P.A., et al., 1993, Science 28, 1323-1327
- 20 Mbawuike, I.N., et al., 1990, Vaccine 8, 347-352
- Mowat, A.M., und Donachie, A.M., 1991, Immunol Today
12, 383-385

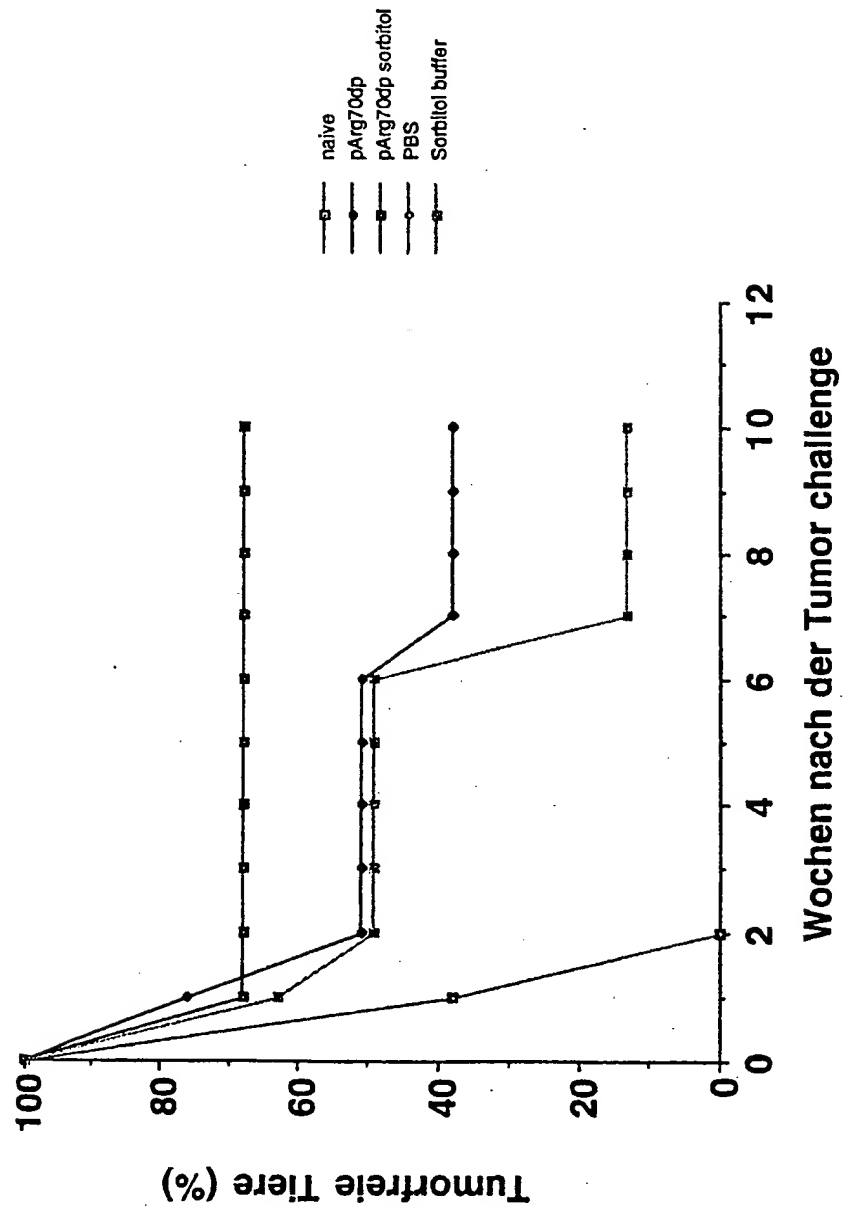
- Newman, M.J., et al., 1992, J Immunol 148, 2357-2362
- Phillips, N.C. und Emili, A, 1992, Vaccine 10, 151-158
- Rammensee, H.G., et al., 1995, Immunogenetics 41,
178-228
- 5 Relyvelt, E.H., 1986, Develop Biol Standard, 65,
131-136
- Ribi, E., 1984, J Biol Res Mod, 3, 1-9
- Stuart-Harris, C.H., 1969, Bull WHO 41, 617-621
- Takahashi, H., et al., 1990, Nature 344, 873-875
- 10 Thapar, M.A., et al., 1991, Vaccine 9, 129-133
- Vogel, F. R. 1995, Ann N Y Acad Sci 754, 153-160
- Warren, H.S., et al., 1986, Ann Rev Immunol 4, 369-388
- Waters, R.V., et al., 1986, Infect Immun 52, 816-825

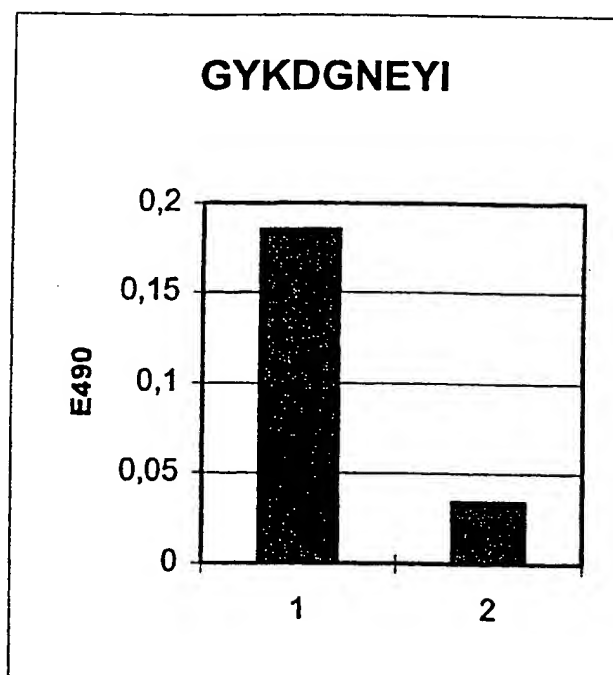
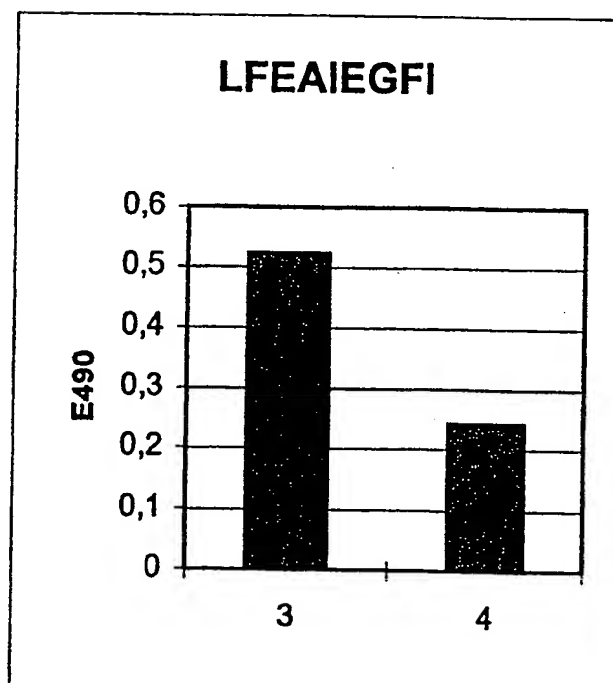
Patentansprüche

1. Vakzine, enthaltend ein oder mehrere synthetische oder hochgereinigte natürliche Peptide oder
5 Proteine als Antigen(e) sowie ein oder mehrere Adjuvantien, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Lösung bzw. Emulsion vorliegt, die frei von anorganischen Salzionen ist bzw. eine niedrige Konzentration anorganischer Ionen aufweist.
- 10 2. Vakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie im wesentlichen frei von Natrium- und Chlorid- und/oder frei von Phosphationen ist.
3. Vakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie im wesentlichen frei von sämtlichen
15 anorganischen Salzionen ist.
4. Vakzine nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine oder mehrere wasserlösliche bzw. wasseremulgierbare Substanzen enthält, die die Fähigkeit haben, die Vakzine
20 isotonisch zu machen und deren immunogene Wirkung zu verstärken.
5. Vakzine nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die isotonisch machende Substanz ausgewählt ist aus der Gruppe Kohlenhydrate, mehrwertige
25 Alkohole, Aminosäuren oder Lipide.
6. Vakzine nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die isotonisch machende Substanz ein Zucker ist.

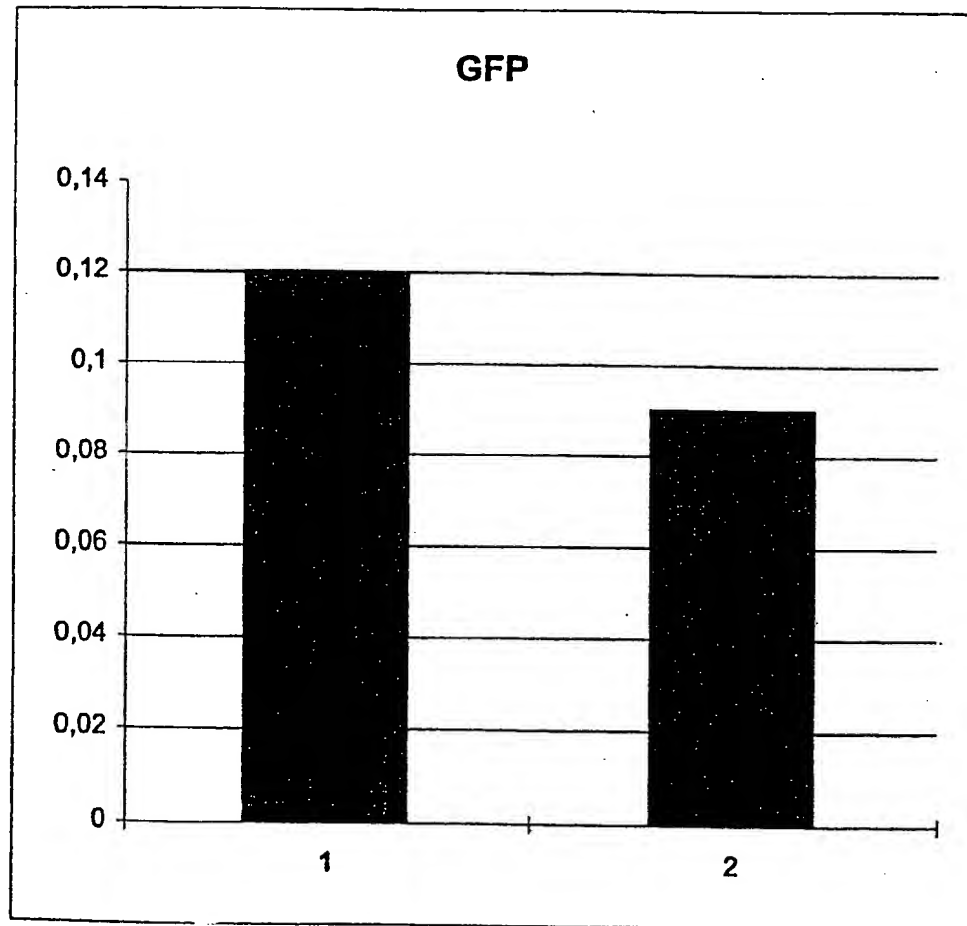
7. Vakzine nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die isotonisch machende Substanz ein Zuckeralkohol ist.
- 5 8. Vakzine nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Zuckeralkohol Sorbit ist.
9. Vakzine nach einem der Ansprüche 4 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die isotonisch machende Substanz in einer Konzentration vorliegt, so daß die resultierende Lösung isotonisch oder leicht
10 hypotonisch ist.
10. Vakzine nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Zucker- bzw. Zuckeralkoholkonzentrationen liegen im Bereich von ca. 200 - 400 mM liegt.
11. Vakzine nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration 250 - 300 mM beträgt.
15
12. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich einen Puffer enthält.
13. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Antigen ein Peptid
20 enthält.
14. Vakzine nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid von einem Tumorantigen abgeleitet ist.
- 25 15. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Adjuvans ein Polykation enthält.

16. Vakzine nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet,
daß sie als Adjuvans Polyarginin enthält.

1/3
Fig. 1

2/3
Fig.2**A****B**

3/3
Fig. 3



PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 39/00, 9/08, 9/107, 39/39	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/38528 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. August 1999 (05.08.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00524 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Januar 1999 (27.01.99) (30) Prioritätsdaten: 198 03 453.9 30. Januar 1998 (30.01.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-55216 Ingelheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BUSCHLE, Michael [DE/AT]; Hyrtlstrasse 35/1/1, A-2345 Brunn/Gebirge (AT). BIRNSTIEL, Max [CH/AT]; Skodagasse 14-16, A-1080 Wien (AT). SCHMIDT, Walter [DE/AT]; Steingasse 2a/16, A-1030 Wien (AT). (74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER INGELHEIM GMBH; Laudien, Dieter, Postfach 200, D-55216 Ingelheim (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe- richts: 9. Dezember 1999 (09.12.99)	
(54) Title: VACCINE FORMULATIONS (54) Bezeichnung: VAKZINEFORMULIERUNGEN (57) Abstract <p>The invention relates to a vaccine containing one or more synthetic or highly purified natural peptides or proteins as antigen(s) as well as one or more adjuvants. The vaccine is presented as a solution or emulsion which is free from inorganic salt ions or has a low concentration of salt ions. Said vaccine preferably contains substances able to make it isotonic, especially sorbitol.</p> (57) Zusammenfassung <p>Eine Vakzine, enthaltend ein oder mehrere synthetische oder hochgereinigte natürliche Peptide oder Proteine als Antigen(e) sowie ein oder mehrere Adjuvantien liegt als Lösung bzw. Emulsion vor, die frei ist von anorganischen Salzionen bzw. eine niedrige Salzionenkonzentration aufweist. Bevorzugt enthält sie Substanzen mit der Fähigkeit, die Vakzine isotonisch zu machen, insbesondere Sorbit.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Letland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/EP 99/00524

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K39/00 A61K9/08 A61K9/107 A61K39/39

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BUSCHLE M ET AL: "Transloading of tumor antigen-derived peptides into antigen-presenting cells." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1997 APR 1) 94 (7) 3256-61. , XP002117665 the whole document ---	1-16
A	WO 95 15768 A (EXNER H.) 15 June 1995 (1995-06-15) page 19 -page 23 ---	1-16
A	WO 97 30721 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 28 August 1997 (1997-08-28) cited in the application the whole document -----	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 October 1999

Date of mailing of the international search report

20/10/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERN. JNAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/00524

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9515768 A	15-06-1995	DE 4445074 A	29-06-1995
		AU 1218295 A	27-06-1995
		DE 4499552 C	17-07-1997
		DE 4499552 D	27-02-1997
		EP 0732936 A	25-09-1996
		JP 9506353 T	24-06-1997
		US 5904925 A	18-05-1999
WO 9730721 A	28-08-1997	DE 19607044 A	28-08-1997
		DE 19638313 A	02-04-1998
		DE 19648687 A	28-05-1998
		AU 1875997 A	10-09-1997
		AU 7694796 A	11-06-1997
		BG 102439 A	29-01-1999
		BR 9611466 A	18-05-1999
		CA 2238176 A	29-05-1997
		CN 1202931 A	23-12-1998
		CN 1211926 A	24-03-1999
		CZ 9801589 A	16-06-1999
		CZ 9802689 A	14-07-1999
		WO 9719169 A	29-05-1997
		EP 0866851 A	30-09-1998
		EP 0881906 A	09-12-1998
		HR 970100 A	30-04-1998
		HU 9901186 A	28-07-1999
		NO 983850 A	21-10-1998
		PL 326756 A	26-10-1998
		PL 328455 A	01-02-1999
		SK 66998 A	02-12-1998

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00524

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9515768 A	15-06-1995	DE 4445074 A	29-06-1995
		AU 1218295 A	27-06-1995
		DE 4499552 C	17-07-1997
		DE 4499552 D	27-02-1997
		EP 0732936 A	25-09-1996
		JP 9506353 T	24-06-1997
		US 5904925 A	18-05-1999
WO 9730721 A	28-08-1997	DE 19607044 A	28-08-1997
		DE 19638313 A	02-04-1998
		DE 19648687 A	28-05-1998
		AU 1875997 A	10-09-1997
		AU 7694796 A	11-06-1997
		BG 102439 A	29-01-1999
		BR 9611466 A	18-05-1999
		CA 2238176 A	29-05-1997
		CN 1202931 A	23-12-1998
		CN 1211926 A	24-03-1999
		CZ 9801589 A	16-06-1999
		CZ 9802689 A	14-07-1999
		WO 9719169 A	29-05-1997
		EP 0866851 A	30-09-1998
		EP 0881906 A	09-12-1998
		HR 970100 A	30-04-1998
		HU 9901186 A	28-07-1999
		NO 983850 A	21-10-1998
		PL 326756 A	26-10-1998
		PL 328455 A	01-02-1999
		SK 66998 A	02-12-1998

ENT COOPERATION TREA. Y

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 21 October 1999 (21.10.99)	
International application No.: PCT/EP99/00524	Applicant's or agent's file reference: 14/043-PCT
International filing date: 27 January 1999 (27.01.99)	Priority date: 30 January 1998 (30.01.98)
Applicant: BUSCHLE, Michael et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
25 June 1999 (25.06.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>J. Zahra</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 14/043-PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/ 00524	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/01/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 30/01/1998
Anmelder BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 2 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- ☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

VAKZINFORMULIERUNGEN

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒

keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K39/00 A61K9/08 A61K9/107 A61K39/39

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BUSCHLE M ET AL: "Transloading of tumor antigen-derived peptides into antigen-presenting cells." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1997 APR 1) 94 (7) 3256-61. , XP002117665 das ganze Dokument ----	1-16
A	WO 95 15768 A (EXNER H.) 15. Juni 1995 (1995-06-15) Seite 19 -Seite 23 ----	1-16
A	WO 97 30721 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 28. August 1997 (1997-08-28) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-16



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Oktober 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

20/10/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

/EP 99/00524

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9515768	A	15-06-1995	DE 4445074 A	29-06-1995
			AU 1218295 A	27-06-1995
			DE 4499552 C	17-07-1997
			DE 4499552 D	27-02-1997
			EP 0732936 A	25-09-1996
			JP 9506353 T	24-06-1997
			US 5904925 A	18-05-1999
<hr/>				
WO 9730721	A	28-08-1997	DE 19607044 A	28-08-1997
			DE 19638313 A	02-04-1998
			DE 19648687 A	28-05-1998
			AU 1875997 A	10-09-1997
			AU 7694796 A	11-06-1997
			BG 102439 A	29-01-1999
			BR 9611466 A	18-05-1999
			CA 2238176 A	29-05-1997
			CN 1202931 A	23-12-1998
			CN 1211926 A	24-03-1999
			CZ 9801589 A	16-06-1999
			CZ 9802689 A	14-07-1999
			WO 9719169 A	29-05-1997
			EP 0866851 A	30-09-1998
			EP 0881906 A	09-12-1998
			HR 970100 A	30-04-1998
			HU 9901186 A	28-07-1999
			NO 983850 A	21-10-1998
			PL 326756 A	26-10-1998
			PL 328455 A	01-02-1999
			SK 66998 A	02-12-1998
<hr/>				

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

REC'D 17 APR 2000

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 14/043-PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/00524	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/01/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 30/01/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K39/00		
Anmelder BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 25/06/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 12.04.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter von Ballmoos, P Tel. Nr. +49 89 2399 8174 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/00524

I. Grundlag des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-15 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-16 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/3-3/3 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	8, 10-11
	Nein: Ansprüche	1-7, 9, 12-16
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	---
	Nein: Ansprüche	1-16
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	---

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Teil V

Folgende Dokumente scheinen besonders relevant zu sein:

D1 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, April 1997, 3262-3267

D2 WO 97/30721

D1, das nicht im Internationalen Recherchenbericht erwähnt ist, wurde von den Anmeldern der vorliegenden PCT-Anmeldung verfasst. Eine Kopie des Dokuments ist deshalb nicht beigelegt.

D1 offenbart die Herstellung von Tumorstoffen. Als Antigen wird das Peptid SYFPEITHI verwendet, das von der Tyrosinkinase JAK-1 stammt. Dieses Peptid findet einerseits in IFA (incomplete Freund's adjuvans) Anwendung als Kontrollstoff und wird andererseits in Verbindung mit einem polykationischen Adjuvans (siehe Zusammenfassung) verwendet. Als Polykation werden Polylysine (pLys) und Polyarginine (pArg) verwendet. Die Ergebnisse (siehe zum Beispiel Abbildungen) belegen den protektiven Effekt der Stoffe, welche pArg und pLys Adjuvantien enthalten. In der linken Spalte von S. 3263 ("Animal Experiments") wird angegeben, dass die Stoffe, enthaltend das Peptid und das Polykation, in einem Gesamtvolumen von 100 µl pro Tier angewendet werden. Diese Passage macht keine Aussage über das gewählte Lösungsmittel. Da jedoch aus dem restlichen Methodenteil (siehe "Synthesis of Fucose-Modified pLys") hervorgeht, dass pLys normalerweise in HEPES-Puffer gelöst wird, scheint auch der Impfstoff, der das Peptid und pArg oder pLys umfasst, in HEPES vorzuliegen. HEPES enthält keinerlei anorganische Ionen.

Somit nimmt D1 die Gegenstände der Ansprüche 1-3 und 12-16 neuheitschädlich vorweg (Art. 33(2) PCT).

Zudem wird darauf hingewiesen, dass die Ansprüche 1-3 so breit gefasst sind, dass ihre Neuheit von jedem Impfstoff, der ein Peptid in Freund's Adjuvans oder IFA enthält, vorweggenommen wird.

D2 (WO 97/30721) offenbart Tumervakzine, enthaltend mindestens ein immunomodulatorisch wirkendes Peptid zusammen mit einem Adjuvans. Das Peptid ist abgeleitet von einem Tumorantigen und als Adjuvantien werden bevorzugt basische Polyaminosäuren wie pArg oder pLys verwendet (siehe Zusammenfassung). In den Beispielen wird als Lösungsmittel HBS verwendet. Die Beschreibung offenbart jedoch weitere wässrige Lösungsmittel, die alternativ eingesetzt werden können, darunter diverse Lösungsmittel, die frei von anorganischen Ionen sind (siehe S. 23, 3. Paragraph, z.B. Wasser, gepuffertes Wasser, Glycinlösung). Im weiteren werden Puffersubstanzen offenbart und Substanzen, die dem Vakzin zugesetzt werden, um einen normalen osmotischen Druck zu erreichen, z.B. Saccharose, Glukose oder Polyethylenglykol.

Damit offenbart D2 alle technischen Merkmale der Ansprüche 1-7, 9, 12-16 und nimmt deren Neuheit vorweg (Art. 33(2) PCT).

Die abhängigen Ansprüche 8 und 10-11 scheinen keine zusätzlichen Merkmale zu enthalten, die in Kombination mit den Merkmalen irgendeines Anspruchs, auf den sie rückbezogen sind, zu einem auf erfinderischer Tätigkeit beruhenden Gegenstand führen könnten. Die Gründe dafür sind die folgenden:

- a) Da der Fachmann aus D2 weiss, dass verschiedene Zucker (Saccharose und Glukose) und Zuckeralkohole (Polyethylenglykol) geeignet sind, um die Vakzine isotonisch zu machen, hätte er auch andere Zuckeralkohole ausgewählt für den gleichen Zweck. Die Wahl von Sorbit scheint ohne erfinderisches Zutun erfolgt zu sein, da die vorliegende Anmeldung keine Basis gibt für einen überraschenden Effekt von Sorbit im Vergleich zu den Zuckern und Zuckeralkoholen aus D2 (Art. 33(3) PCT).
- b) Der Fachmann kann durch einfache Berechnungen oder Routineversuche die Zuckerkonzentrationen ermitteln, die notwendig sind, um eine isotonische Lösung zu erhalten. Er würde deshalb ohne Anwendung von erfinderischer Tätigkeit zum Gegenstand der Ansprüche 10 und 11 gelangen (Art. 33(3) PCT).

Teil VII

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in dem Dokument D1 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch dieses Dokument angegeben.

Teil VIII

- a) Der Begriff "niedrige Konzentration" hat keine klar definierte Bedeutung und macht somit den Gegenstand des Anspruchs 1 und der davon abhängigen Ansprüche 2-16 unklar (Art. 6 PCT).
- b) In der Legende von Fig. 1 sind 5 Versuchsansätze dargestellt. Dagegen scheinen in der Abbildung die Ergebnisse der PBS-Kontrolle zu fehlen, wodurch die Abbildung unklar wird. Das Beispiel 1a der Beschreibung erklärt diese Widersprüche nicht, da gemäss dieser Anleitung auch nur 4 Ansätze durchgeführt wurden.

16C1
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT**RECEIVED****INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

DEC 07 2000

09601171

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER 1600/2800

Applicant's or agent's file reference 14/043-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/00524	International filing date (day/month/year) 27 January 1999 (27.01.99)	Priority date (day/month/year) 30 January 1998 (30.01.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 39/00, 9/08, 9/107, 39/39		
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 25 June 1999 (25.06.99)	Date of completion of this report 12 April 2000 (12.04.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

International application No.

I. Basis of the report

☒ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-15, as originally filed,

pages _____, filed with the demand.

pages _____, filed with the letter of

pages _____, filed with the letter of

☒ the claims, Nos. 1-16, as originally filed,

Nos. _____, as amended under Article 19,

Nos. _____, filed with the demand,

Nos. _____, filed with the letter of

Nos. _____, filed with the letter of

☒ the drawings, sheets/fig 1/3-3/3, as originally filed,

sheets/fig _____, filed with the demand,

sheets/fig _____, filed with the letter of

sheets/fig _____, filed with the letter of

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

Form PCT/IPEA/409 (Box I) (January 1994)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/00524

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	8, 10 and 11	YES
	Claims	1 - 7, 9, 12 - 16	NO
Inventive step (IS)	Claims	---	YES
	Claims	1 - 16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 16	YES
	Claims	---	NO

2. Citations and explanations

The following documents appear to be particularly relevant:

D1 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, April 1997,

3262 - 3267

D2 WO-A-97/30721

D1, which is not mentioned in the international search report, was written by the applicants of the present PCT application. A copy of the document is therefore not appended.

D1 discloses the preparation of tumour vaccines. The antigen used is the peptide SYFPEITHI, which is derived from tyrosine kinase JAK-1. That peptide is used on the one hand as a control vaccine in IFA (incomplete Freund's adjuvant) and on the other hand in combination with a polycationic adjuvant (see the abstract). Polylysine (pLys) and polyarginine (pArg) are used as the polycation. The results (see, for example, the figures) demonstrate the protective effect of the vaccines containing pArg and pLys adjuvants. In the left-hand column on page 3263 ("Animal Experiments"), it is stated that the vaccines containing the peptide and the polycation are applied in a total

.../...

(Continuation of V.2)

volume of 100 μ l per animal. That passage does not mention the chosen solvent. But since it is clear from the rest of the method section (see "Synthesis of Fucose-Modified pLys") that pLys is normally dissolved in HEPES buffer, the vaccine containing the peptide and pArg or pLys also appears to be present in HEPES. No inorganic ions of any kind are present in HEPES.

Consequently, D1 anticipates the subjects of Claims 1 - 3 and 12 - 16 in a manner prejudicial to novelty (PCT Article 33(2)).

It should also be noted that Claims 1 - 3 are so broadly worded that their novelty is anticipated by every vaccine containing a peptide in Freund's adjuvant or IFA.

D2 (WO-A-97/30721) discloses tumour vaccines containing at least one immunomodulatory peptide together with an adjuvant. The peptide is derived from a tumour antigen and the adjuvants used are preferably basic polyamino acids such as pArg or pLys (see the abstract). HBS is the solvent used in the examples. The description, however, discloses further aqueous solvents which can be used alternatively, including various solvents free from inorganic ions (see page 23, third paragraph, e.g., water, buffered water, glycine solution). In addition, buffer substances are disclosed as are substances which are added to the vaccine in order to achieve a normal osmotic pressure, for example saccharose, glucose or polyethylene glycol.

Consequently, D2 discloses all the technical features of Claims 1 - 7, 9 and 12 - 16 and anticipates their novelty (PCT Article 33(2)).

.../...

(Continuation of V.2)

Dependent Claims 8, 10 and 11 do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any one of the claims to which said claims refer, could yield subject matter involving an inventive step. The reasons are as follows:

- a) Since a person skilled in the art knows from D2 that various sugars (saccharose and glucose) and sugar alcohols (polyethylene glycol) are suitable for making the vaccines isotonic, he would also have chosen other sugar alcohols for the same purpose. The choice of sorbit does not appear to have involved an inventive step, because the present application provides no basis for a surprising effect of sorbit in comparison with the sugars and sugar alcohols of D2 (PCT Article 33(3)).
- b) A person skilled in the art can determine, by simple calculations or routine tests, the sugar concentrations necessary for obtaining an isotonic solution. He would therefore arrive at the subjects of Claims 10 and 11 without exercising inventive skill (PCT Article 33(3)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/00524

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

The description did not cite document D1 or briefly outline the relevant prior art contained therein, in contravention of the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/00524

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

- a) The term "low concentration" has no clearly defined meaning and therefore makes the subjects of Claim 1 and its dependent Claims 2 - 16 unclear (PCT Article 6).
- b) Keys to 5 tests are included in the caption to Figure 1. On the other hand, the results of the PBS test appear to be missing from the figure, which is therefore unclear. Example 1a of the description does not elucidate these inconsistencies, because it indicates that only 4 tests are carried out.



Creation date: 12-08-2003

Indexing Officer: ACHUNVICHIT - ANTHONY CHUNVICHIT

Team: OIPEBackFileIndexing

Dossier: 09601171

Legal Date: 10-26-2000

No.	Doccode	Number of pages
1	LET.	2
2	IDS	2
3	NPL	10
4	NPL	8
5	NPL	9
6	NPL	4
7	NPL	20
8	NPL	7
9	NPL	12
10	NPL	11
11	NPL	11
12	NPL	16
13	NPL	9
14	NPL	9
15	NPL	7
16	NPL	8
17	NPL	4
18	NPL	8
19	NPL	10
20	NPL	8
21	NPL	11
22	NPL	7
23	NPL	4
24	NPL	7
25	NPL	10
26	NPL	13
27	NPL	12

Total number of pages: 239

Remarks: